UTILISATION DE SOUCHES BACTERIENNES ANTAGONISTES DE MONILIA SP. Test de différentes concentrations et de deux procédures (blessure et trempage)

François Warlop (GRAB), Christelle Dijoud (Stagiaire)

Depuis 2001, un travail a été entrepris pour isoler et tester des agents microbiens capables de limiter le développement des monilioses en conservation, testés par inoculation artificielle.

Le travail réalisé cette année poursuit les essais des années précédentes, en améliorant le protocole utilisé, puisque plusieurs doses sont testées, et deux modes d'application utilisés, afin d'approcher les conditions pratiques d'utilisation.

Fruit : pommes Golden Delicious & Gala
Pathogène : *Monilia sp.*
Antagonistes bactériens : J2 et J11

Trois essais successifs sont présentés dans ce compte-rendu.

1 - METHODE

Préparation des suspensions

Monilia sp.

- En conditions stériles (hotte à flux laminaire), récupérer les conidies présentes sur les pêches (inoculées 4 à 5 jours plus tôt) à l'aide d'un pinceau, les mettre en suspension dans un tube de 4.5 ml d'eau physiologique (90 mg de NaCl dans 10 ml d'eau distillée) avec 0.05% de tween 80.
- Homogénéiser
- Compter avec une cellule de Malassez (voir mode d'emploi hématimètre) sous microscope (objectif X20) avec un fort contraste (Ph1) et peu de lumière
  ⇨ 198 conidies dans 40 rectangles : $5*10^5$ conidies.ml^{-1}
- Ajuster à 10^4 conidies.ml^{-1} en diluant 50 fois, soit 100µl dans 5ml d'eau physiologique stérile

J2 et J11

- Sous la hotte, repiquer les deux souches dans une boîte de milieu TSA 24 à 48 h avant la mise en suspension
- Prélever des bactéries grâce à une anse stérile, les mettre en suspensions dans 4.5 ml d'eau physiologique
- Homogénéiser au vortex
- Mesure de densité optique (D.O.) à 580 nm
- Détermination de la concentration [c] de la solution grâce aux résultats obtenus par spectrophotométrie en 2003 :

Souches bactériennes	D.O mesurée	Equation	Concentration (UFC.ml^{-1})
J2	0.675	[c]= D.O/($4.76*10^{-10}$)	[J2] = $14.1*10^8$
J11	0.033	[c]= D.O/($4.69*10^{-10}$)	[J11] = $7*10^7$

- Ajustement à 10^8 et 10^7UFC.ml^{-1} par dilution

Concentrations finales observées : [J2] : $1.4*10^8$ et $1.4*10^7$ UFC.ml^{-1}
[J11] : $7*10^7$ et $1.4*10^7$ UFC.ml^{-1}

Inoculation des pommes

- lots de 10 fruits par modalité
- Faire un trou sur chaque joue à l'aide du perceur calibré en inox
- Introduire les 15µl du traitement correspondant (voir tableau ci-dessous)
- 1 heure plus tard, introduire au même endroit 15µl de la solution de *Monilia sp.*

Modalités testées

Trois essais successifs sont présentés ; les modalités sont les mêmes dans les deux premiers essais :

Quantité de solution en µl pour chaque modalité et chaque blessure :

MODALITES	**Eau physiologique**	**J2** 10^7	**J2** 10^8	**J11** 10^7	**J11** 10^8	**Iprodione** (Rovral®)	***Monilia sp.*** **10^4**
1 (témoin positif)	15						15
2		15					15
3			15				15
4				15			15
5					15		15
6 (témoin négatif)						15	15

(Iprodione = référence chimique)

Dans le 3e essai, l'application des agents antagonistes est réalisée par *trempage* des fruits, pour se rapprocher des conditions d'utilisation pratique.
La concentration en antagonistes est alors de 10^7 UFC/ml.

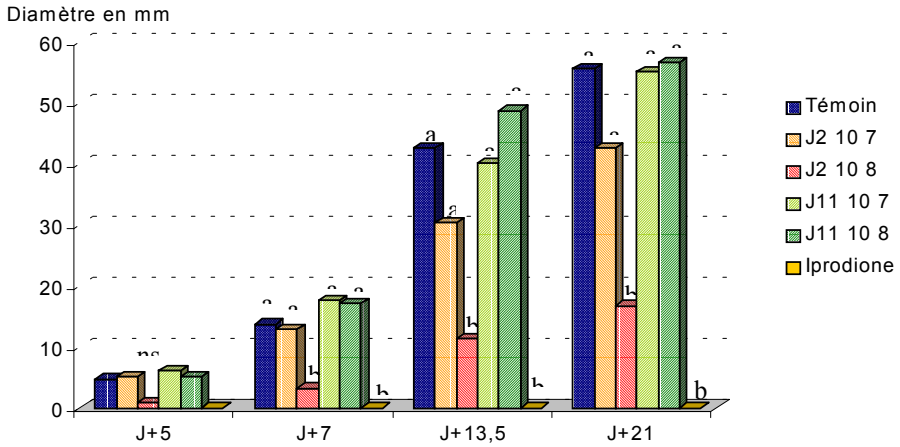
Observations

Mesure du diamètre des lésions deux fois par jour à l'aide du pied à coulisse, pendant 14 à 20 jours selon l'évolution des lésions.

2 - RESULTATS

ESSAI 1

La température moyenne durant l'expérience est de 20°C, un maximum de 21.3° et un minimum de 18.3° ont respectivement été relevés le 10/10/06 et le 23/10/06.



Développement du Monilia laxa face aux antagonistes bactérien

a, b : groupes homogènes formés par un test de Newman-Keuls pour α = 0.05 ; ns : test non significatif

Les premières mesures de diamètre peuvent être réalisées 4.5 jours après l'inoculation, en dehors des pommes traitées à l'Iprodione, qui ne présentent aucun développement du *Monilia* sp.
Le diamètre moyen est inférieur à 17 mm pour J2 à 10^8 UFC.ml^{-1} et à 43mm pour J2 à 10^7 UFC.ml^{-1}, alors qu'il est d'environ 55 mm pour les autres modalités : J2 semble donc relativement efficace.
Avec J11, et quelque soit la concentration utilisée, les lésions sont légèrement plus importantes que sur le témoin. Cependant, J11 ne s'est pas développé correctement après le repiquage effectué la veille de la préparation de la suspension ; il est donc probable que les cellules bactériennes de cette souche n'étaient pas viables au moment du traitement. Le pathogène s'est développé sans interaction entre les deux populations et aucun antagonisme n'a été possible.

Taille des lésions (diamètre en mm) et efficacités :

Date d'observation	***J+5***		***J+7***		***J+13***		***J+21***	
Témoin non traité	4,75 NS		13.78 A		42.53 A		55.68 A	
J2 à 10^7	5.08 NS	(-6.8%)	12.83 A	(6.9%)	30.43 A	(28.5%)	42.68 A	(23.3%)
J2 à 10^8	0.85 NS	(82.1%)	**3.25 B**	**(76.4%)**	**11.38 B**	**(73.3%)**	**16.75 B**	**(69.9%)**
J11 à 10^7	6.13 NS	(-28.9%)	17.55 A	(-27.4%)	40.18 A	(5.5%)	55.10 A	(1%)
J11 à 10^8	5.10 NS	(-7.4%)	17.20 A	(-24.9%)	48.73 A	(-14.6%)	56.75 A	(-1.8%)
Iprodione	0 NS	(100%)	**0 B**	**(100%)**	**0 B**	**(100%)**	**0 B**	**(100%)**
Ecart-type résiduel	8.7		13.3		28.2		27.8	

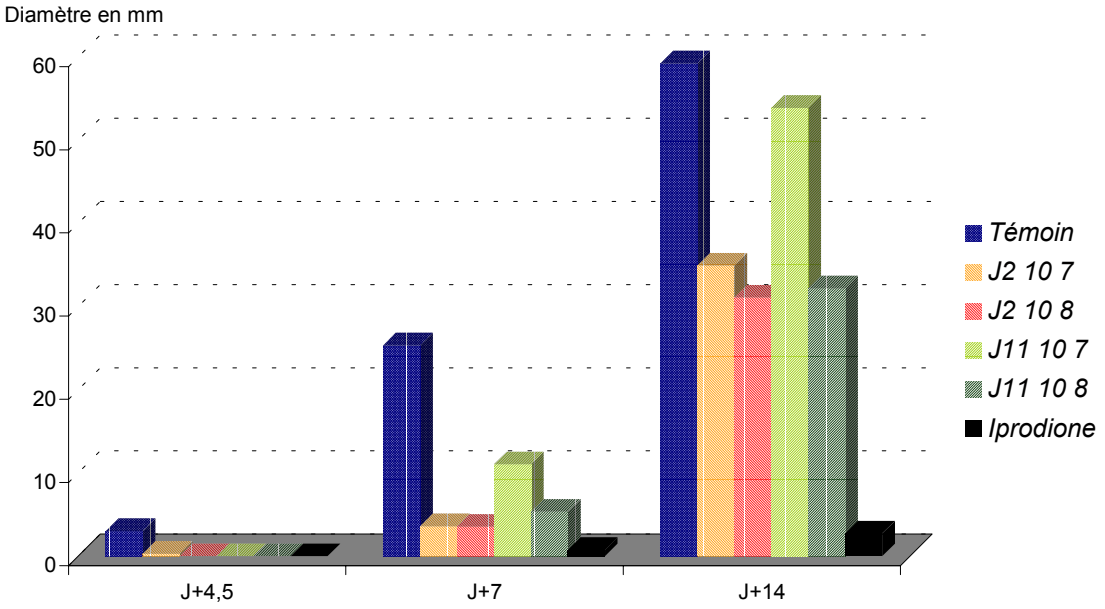
A, B : groupes formés par un test de Newman Keuls pour α = 0.05 *NS : test non significatif*
(x%) : efficacité par rapport au témoin

CONCLUSIONS :

A partir de J+5, les résultats du traitement avec J2 à 10^8 UFC.ml^{-1} ne sont pas significativement différents de ceux obtenus grâce à l'iprodione.

A la concentration de 10^8 UFC.ml^{-1}, on obtient une efficacité moyenne de 73.3% : J2 peut ici être considérée comme aussi efficace que le traitement chimique de référence.

ESSAI 2



Développement du Monilia sp. face aux antagoniste

a, b, c : groupes homogènes formés par un test de Newman-Keuls pour α = 0.05

Taille des lésions (en mm) et efficacité

Date d'observation	***J+4.5***		***J+7***		***J+14***	
Témoin non traité	3 A		25.4 A		59.3 A	
J2 à 10^7	**0.3 B**	**(90.1%)**	**3.6 BC**	**(89.2%)**	**35 B**	**(41.1%)**
J2 à 10^8	**0 B**	**(100%)**	**3.6 BC**	**(92.5%)**	**33.1 B**	**(47.6%)**
J11 à 10^7	**0 B**	**(100%)**	**11.1 B**	**(73.5%)**	53.9 A	(9.1%)
J11 à 10^8	**0 B**	**(100%)**	**5.4 BC**	**(77.6%)**	**32.2 B**	**(45.7%)**
Iprodione	**0 B**	**(100%)**	**0.8 C**	**(100%)**	**2.8 C**	**(95.4%)**
Ecart-type résiduel	2.6		9.55		19.1	

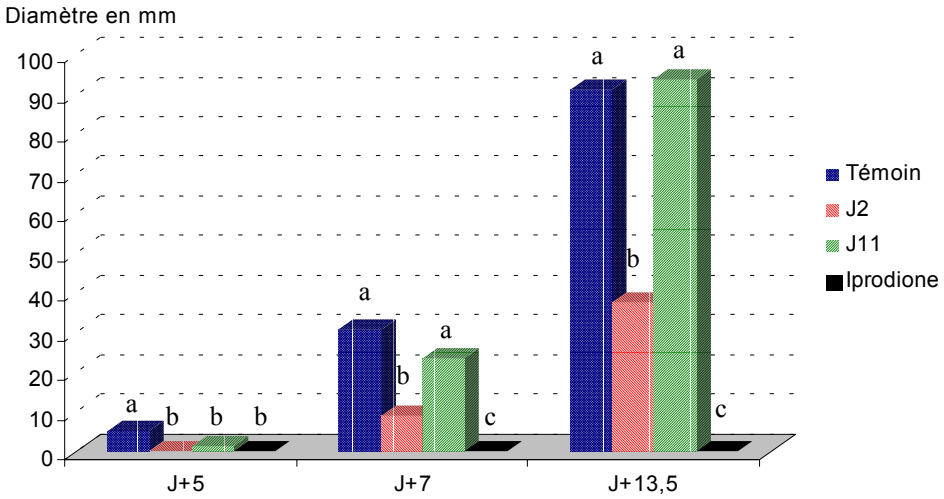
A, B, C : groupes formés par un test de Newman Keuls pour α = 0.05

CONCLUSIONS

A partir de 11,5 jours, la souche J11 n'a plus aucun effet significatif si elle est appliquée à une concentration de 10^7UFC.ml^{-1}. Il faut exposer les conidies de *Monilia laxa* à dix fois plus de bactéries de cette souche, dès le début de l'expérience, pour obtenir une efficacité semblable à celle de la souche J2. Pourtant, l'effet de la concentration initiale en bactéries J2 n'affecte pas ou très peu l'efficacité (-3.5%). Il semble donc qu'il y ait un seuil à atteindre au niveau de la concentration du traitement pour que les bactéries entre en concurrence avec le *Monilia sp.* . Ce seuil serait différent pour chaque souche : 10^7 UFC.ml^{-1} pour J2 et 10^8 UFC.ml^{-1} pour J11.

ESSAI 3

Voici les résultats des développements de lésions, obtenus après trempage des fruits dans les solutions d'antagonistes :



Développement du Monilia sp. face aux antagonistes appliqués par trempage
a, b, c : groupes homogènes formés par un test de Newman-Keuls pour α = 0.05

Taille des lésions (en mm) et efficacité

Date d'observation	***J+5***		***J+7***		***J+13***	
Témoin non traité	5.1 A		31 A		91.3 A	
J2 10^7	**0 B**	**(100%)**	**9.1 B**	**(65.9%)**	**37.7 B**	**(58.8%)**
J11 10^7	**1.5 B**	**(70.6%)**	23.8 A	(6.6%)	94 A	(-2.9%)
Iprodione	**0 B**	**(100%)**	**0 C**	**(100%)**	**0 C**	**(100%)**
Ecart-type résiduel	4.1		11.7		25.0	

A, B, C : groupes formés par un test de Newman-Keuls avec α = 0.05
(x%) : efficacité par rapport au témoin

CONCLUSIONS

Les premiers symptômes apparaissent 4 jours après l'inoculation. Au bout de 12 jours, les pommes de la modalité témoin sont entièrement pourries. Les fruits traités avec J11 pourrissent autant que le témoin.
Aucun développement de *Monilia sp.* n'a eu lieu en présence d'Iprodione et il est très inhibé par J2, qui présente des efficacités intéressantes pouvant aller encore jusqu'à 66%.
Le trempage semble donc présenter un intérêt, jusqu'ici inférieur à l'application par inoculation.
Son développement devra toutefois être optimisé pour pouvoir envisager de travailler avec ce genre d'antagonistes.

ANNEE DE MISE EN PLACE : 2000 - ANNEE DE FIN D'ACTION : 2010
ACTION : nouvelle ○ en cours ● en projet ○
Renseignements complémentaires auprès de : C. Gomez, G. Libourel, S–J Ondet, L. Romet et F. Warlop
GRAB Agroparc BP 1222 84911 Avignon cedex 9 tel 04 90 84 01 70 fax 04 90 84 00 37 mail : warlop.grab@tiscali.fr

Mots clés du thésaurus Ctifl : Agriculture Biologique ; maladies de conservation, pêches, post-récolte, huiles essentielles
Date de création de cette fiche : janvier 2007